

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO CURITIBANOS  
ANDRÉ THIAGO MUNHOZ

**TÉCNICAS DE INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DE FIXAÇÃO DE  
NITROGENIO NA CULTURA DA SOJA**

Curitibanos  
2016

**ANDRÉ THIAGO MUNHOZ**

**TÉCNICAS DE INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DE FIXAÇÃO DE  
NITROGENIO NA CULTURA DA SOJA**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao curso de Agronomia, do  
campus Curitibanos da Universidade  
Federal de Santa Catarina como requisito  
para a obtenção do título de Bacharel em  
Agronomia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Sonia Purin da  
Cruz

Curitibanos  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Munhoz, André Thiago  
Técnicas de inoculação com bactérias de fixação de  
nitrogênio na cultura da soja / André Thiago Munhoz ;  
orientador, Sonia Purin da Cruz - Curitiba, SC, 2016.  
49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus  
Curitiba. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Técnicas de inoculação na cultura da  
soja. . I. da Cruz, Sonia Purin. II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Graduação em Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
**Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia**  
Rodovia Ulysses Gaboardi km3  
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC  
TELEFONE (048) 3721-2178 8-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

ANDRÉ THIAGO MUNHOZ

## **TÉCNICAS DE INOCULAÇÃO COM BACTÉRIAS DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DA SOJA.**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao  
Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus  
Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito para obtenção do título de Bacharel em  
Agronomia.

**Orientador(a): Sonia Purin da Cruz**

Data da defesa: 12 de julho de 2016

**MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA :**

**Presidente e Orientador:** Sonia Purin da Cruz  
**Titulação:** Ph.D.  
**Área de concentração:** Microbiologia Ambiental  
**Universidade Federal de Santa Catarina**

**Membro Titular:** Cesar Eduardo Kersting  
**Titulação:** Mestre  
**Área de concentração:** Forragicultura  
**Instituição:** Total Biotecnologia

**Membro Titular:** Samuel Luiz Fioreze  
**Titulação:** Doutor  
**Área de concentração:** Produção Vegetal  
**Instituição:** Universidade Federal de Santa Catarina

Local: Universidade Federal de Santa Catarina  
Campus de Curitibanos  
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus pela minha vida, oportunidade, saúde e força para superar e vencer mais esta batalha.
- A minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. A minha mãe Simone que me deu incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu pai Dalcio que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu. E ao meu irmão Gabriel que foi muito importante.
- A minha orientadora Professora Dra. Sonia Purin da Cruz pelos ensinamentos, incentivos, orientação, apoio e confiança.
- Aos meus avós, tios, primos e namorada que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.
- A empresa Total Biotecnologia Indústria e Comércio Ltda, que prontamente permitiu a realização do referido trabalho e colocou a disposição todas as informações que fossem necessárias para o desenvolvimento prático e teórico.
- Aos meus Amigos pelo carinho.
- A Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitibanos pela contribuição valiosa.
- A todos os professores e docentes da faculdade que auxiliaram na minha formação.
- E a todos que de alguma forma fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

# **Técnicas de inoculação com bactérias de fixação de nitrogênio na cultura da soja**

**André Thiago Munhoz**

## **Resumo**

A soja (*Glycine max*) é uma das culturas mais importantes no cenário mundial. Para o bom desenvolvimento da cultura o nitrogênio é nutriente mais requerido. Este pode ser disponibilizado pela Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). A FBN é a mais utilizada no Brasil e é realizada por alguns gêneros de bactérias, comercializadas na forma de inoculante. Os inoculantes são aplicados da forma tradicional realizada nas sementes, porém, existem outras metodologias: em pulverização, pós-emergência, pré-semeadura e coinoculação. O objetivo do presente trabalho foi testar o uso de diferentes técnicas de inoculação de sementes sobre o crescimento, nodulação e produtividade na cultura da soja. O experimento foi realizado em Ponte Alta do Norte – SC, conduzido a campo em um delineamento em blocos ao acaso, com onze tratamentos e cinco repetições. Foram realizadas duas coletas sendo uma delas aos 32DAE e outra no estágio R2. Além destas, uma terceira coleta foi realizada para produtividade. No desenvolvimento inicial aos 32 DAE, as médias das três variáveis de nodulação na raiz principal foram superiores no tratamento com inoculante turfoso com aditivo em relação ao padrão. Nas raízes secundárias, as médias dos tratamentos de coinoculação em pulverização no sulco de semeadura foram superiores a da inoculação padrão. Já para os valores de número total de nódulos os tratamentos, de coinoculação em pulverização no sulco de semeadura e o de inoculante turfoso com aditivo, tiveram valores superiores ao tratamento padrão. Para a variável massa seca de nódulos os tratamentos de inoculante turfoso com aditivo e de coinoculação com 3 inoculantes em pulverização no sulco foram superiores ao tratamento de inoculação padrão. A massa seca da parte aérea não teve diferença estatística entre os tratamentos. Na segunda coleta no período R2, observou-se que no tratamento de coinoculação com 3 inoculantes pulverizado no sulco de semeadura, as médias das três variáveis de nodulação da raiz principal foram superiores ao tratamento padrão. Além disso, para a variável número total de nódulos o tratamento de inoculação em pulverização pós emergência também

foi superior. Para as três variáveis das raízes secundárias, o tratamento de coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 2 inoculantes foi maior que no tratamento padrão. Além disso, para a variável número total de nódulos o tratamento de inoculação em pulverização pós emergência também foi superior quando comparado com a inoculação padrão. Em relação ao número total de nódulos por planta, os tratamentos coinoculação em pulverização tiveram médias superiores comparadas ao tratamento padrão. As médias da massa seca de nódulos de todos os tratamentos foram estatisticamente iguais. Para a variável produtividade, os tratamentos com adubação nitrogenada, com inoculante turfoso com aditivo, inoculação 7 dias pré-semeadura com aditivo, pós-emergência e os tratamentos de pulverização foram superiores ao tratamento padrão. Com base nos resultados observados, pode-se concluir que as técnicas de inoculação no sulco, pré-inoculação e coinoculação podem ser recomendadas para o cultivo da soja, pois proporcionam crescimento e produtividade iguais ou superiores à tecnologia padrão de inoculação.

**Palavras-Chave:** Inoculação padrão da soja. Inoculação em pulverização. Inoculação pós-emergência. Inoculação pré-semeadura. Coinoculação.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Croqui da área do experimento realizado. O experimento contou com 5 repetições, representadas pelos blocos. Cada repetição continha 11 tratamentos que foram distribuídos aleatoriamente. O espaçamento entre parcelas foi de 1 m. ....	18
<b>Figura 2.</b> Efeito de diferentes tratamentos de inoculação de soja sobre a produtividade em grãos.....	35
<b>Figura 3.</b> Análise de determinação da presença de rizóbios no solo (NMP).....	48
<b>Figura 4.</b> Análise química do solo da área de estudo. ....	49



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Caracterização dos resultados da análise química do solo da área de estudo.....	17
<b>Tabela 2.</b> Efeito de diferentes tratamentos de inoculação da soja sobre o numero de nódulos, nódulos maiores que 2mm, nódulos viáveis presentes nas raízes principal e secundárias, numero de nódulos por planta, massa seca de nódulos por planta, e massa da parte aérea, aos 32 dias após a emergência (estádio V6). ....	24
<b>Tabela 3.</b> Efeito de diferentes tratamentos de inoculação da soja sobre o numero de nódulos, nódulos maiores que 2 mm, nódulos viáveis presentes nas raízes principal e secundárias, número de nódulos por planta e massa seca de nódulos por planta no florescimento pleno (estádio R2).....	28
<b>Tabela 4.</b> Efeito de diferentes tratamentos de inoculação de soja sobre a produtividade em grãos.....	50

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
3.1	NODULAÇÃO DE RAÍZES AOS 32 DAE .....	23
3.2	MASSA DE MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA .....	27
3.3	NODULAÇÃO DE RAÍZES NO ESTÁDIO R2 .....	27
3.4	PRODUTIVIDADE .....	34
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
	<b>Abstract.....</b>	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa originária da China. Atualmente é um dos principais produtos utilizados e comercializados no mundo, com finalidade de alimentação humana e animal (CAPONE, 2015). Além da alimentação, ela também vem sendo utilizada como alternativa na fabricação de biodiesel (SANTOS, 2013).

A produção mundial de soja na safra de 2014/2015 foi de 317,253 milhões de toneladas, ocupando uma área plantada de 118,135 milhões de hectares. Os Estados Unidos são os principais produtores de soja do mundo, com um percentual de 34% da produção mundial e produtividade de 3213 kg ha<sup>-1</sup> (EMBRAPA, 2015). No Brasil, a soja firmou-se como um dos produtos de destaque na agricultura nacional e na balança comercial (MISSÃO, 2006). No cenário brasileiro, cerca de 49% da área plantada de grãos é ocupada com soja (MAPA, 2014), pelo fato de que, dentre todas as culturas agrícolas cultivadas no país, ela foi a que mais cresceu nas últimas três décadas (MISSÃO, 2006). Segundo Missão (2006), ela é considerada um *commodity* dentro do Brasil. O país é responsável por produzir em média 30% da produção mundial da cultura, apresentando produtividade média aproximada de 3011 kg ha<sup>-1</sup> (EMBRAPA, 2015). No panorama brasileiro, o estado do Mato Grosso é o maior produtor de soja, com uma área de 8.584 mil hectares, e o estado do Paraná tem a maior produtividade do país, com 3293 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2015). Santa Catarina está um pouco atrás desses números, apresentando uma área plantada com cerca de 560 mil hectares e produtividade média de 3000 kg ha<sup>-1</sup> (CEPA, 2014).

A cultura da soja é exigente em vários nutrientes para um bom desenvolvimento, e dentre eles o nitrogênio é o mais requerido, sendo necessários 80 kg de N para produzir 1000 kg de soja (HUNGRIA; CAMPO, 2000). O fornecimento do N pode ser realizado de três formas: mineral, orgânica e pela Fixação Biológica de Nitrogênio - FBN (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). Dentre eles, a FBN é a mais comumente adotada no Brasil e assume extrema importância visto que é capaz de suprir toda a exigência de

nitrogênio pela soja ao longo do ciclo de cultivo, dispensando totalmente a necessidade de qualquer insumo químico (ROLAS 2004).

A FBN é realizada por alguns gêneros de bactérias que tem capacidade de captar o nitrogênio presente no ar e convertê-lo a formas assimiláveis. Essas bactérias são comercializadas mundialmente na forma de inoculantes que podem ser encontrados na forma turfosa ou líquida (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). No Brasil, existem atualmente quatro estirpes registradas para o uso na soja perante o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): a espécie *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587, SEMIA 5019 (=29 w) e a espécie *Bradyrhizobium diazoefficiens* (previamente classificada como *Bradyrhizobium japonicum*) SEMIA 5079 (= CPAC 15) e SEMIA 5080 (=CPAC 7) (CAMPOS; HUNGRIA; TEDESCO, 2001).

A inoculação considerada padrão para a cultura da soja consiste em misturar o inoculante com a semente e realizar a semeadura em no máximo 24 horas (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). Após a germinação das sementes, as bactérias entram em contato com as raízes da planta e iniciam a infecção radicular através dos pelos, formando posteriormente nódulos. Dependendo do número de nódulos e da eficiência da FBN, a inoculação pode fornecer todo o N do qual a soja necessita (ARAÚJO, 1999). Além da inoculação tradicional, existem outras metodologias que incluem a inoculação no sulco de semeadura, a inoculação pós-emergência, inoculação pré-semeadura e um pacote coinoculação (RONSANI; PINHEIRO; PURIN, 2013).

A inoculação no sulco de semeadura pode ser uma substituição do método tradicional de inoculação. Ela é feita na linha de semeadura, ou seja, na abertura do sulco onde são depositados fertilizantes e as sementes. Para que este procedimento possa ser adotado, a dose de inoculante deve ser no mínimo, seis vezes superior à dose indicada para a inoculação padrão (EMBRAPA, 2004). A utilização desse método tem a vantagem de reduzir os efeitos tóxicos do tratamento de sementes com fungicidas e da aplicação de micronutrientes nas sementes sobre a bactéria (EMBRAPA, 2004). Desta maneira, o primeiro contato entre o inoculante e a semente acontece no momento da semeadura (VIERA NETO; PIRES; MENEZES, et al., 2008).

Segundo estudo de Zilli et al. (2010), a inoculação no sulco de semeadura mostra que a produtividade de grãos é maior em 20% (mais de 500 kg ha<sup>-1</sup>), comparada ao tratamento de inoculação em sementes. Isto indica a inoculação no sulco de semeadura como uma alternativa para tornar compatível a inoculação de sementes de soja tratadas com estirpes de *Bradyrhizobium*. Um trabalho realizado no estado do Paraná mostrou que a inoculação no sulco de semeadura resultou em produtividade maior comparado a inoculação tradicional utilizada no país. O trabalho foi realizado em duas cidades: Londrina e Ponta Grossa. Na primeira, houve um aumento na produtividade de 77 kg por ha<sup>-1</sup> na safra de 2009/10, enquanto na segunda a produtividade foi incrementada na ordem de 276 kg por ha<sup>-1</sup> (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013).

Outro método alternativo para a inoculação tradicional é a inoculação pós-emergência, que é realizada após as plantas já estarem em seu período vegetativo. Nesta técnica, uma suspensão do inoculante com água é preparada e pulverizada sobre a linha de plantio onde as plantas emergiram. Esta técnica consiste em uma alternativa, caso aconteça alguma falha na inoculação padrão e haja comprometimento da nodulação (ZILLI; MARSON; GIANLUPPI et al., 2008). Segundo estudo de Zilli et al. (2008), a inoculação pós-emergência promove boa nodulação e uma produtividade de 2900 kg ha<sup>-1</sup>, representando parâmetros iguais a inoculação padrão realizada na semente. Além disso, é uma técnica que poder ser recorrida, caso aconteça a morte bacteriana após as sementes já estarem em contato com o solo. No Brasil, entretanto, outros estudos de inoculação pós-emergência são necessários para melhor compreender-se os reais benefícios e limitações desta metodologia de inoculação.

Um dos principais fatores limitantes da inoculação tradicional (ou seja, padrão) é o fato de que o procedimento deve ser feito dentro de até 24 horas antes do plantio, para que a sobrevivência das bactérias seja garantida (ZILLI; RUBENS; HUNGRIA, 2010). Sabendo dessa limitação, pesquisas vêm sendo realizadas para poder armazenar as sementes uma vez inoculadas por um período maior que um dia. Trabalhos sobre este assunto são escassos, sendo que existem apenas dois estudos publicados até o momento no âmbito

nacional. Ambos os estudos revelam que a inoculação pré-semeadura é eficiente apenas para sementes não tratadas, e não há registro de estudos sobre a eficácia da inoculação pré-semeadura de sementes tratadas, as quais são as mais utilizadas na atualidade no Brasil (ZILLI; RUBENS; HUNGRIA, 2010). Segundo o estudo desenvolvido por Zilli et al. (2010), a inoculação feita cinco dias pré-semeadura resulta em produtividade de 250kg ha<sup>-1</sup> a mais que na inoculação padrão. Porém, este estudo foi realizado com sementes sem tratamentos químicos, o que contraria a realidade brasileira, na qual, as sementes comercializadas no país utilizam de algum tipo de tratamento (ZILLI; RUBENS; HUNGRIA, 2010). Um segundo trabalho testou o uso de um produto chamado Bioagro NG, que permite inocular sementes até 15 dias antes da semeadura, porém as sementes também não poderiam ter contato com nenhum tipo de tratamento químico (RUFINO, 2013). De acordo com estes trabalhos, percebe-se que a técnica de inoculação pré-semeadura traz bons resultados para as sementes que não passaram por nenhum tratamento químico, porém a maioria dos agricultores brasileiros utilizam sementes tratadas. Assim, ressalta a grande necessidade de produtos que permitam a sobrevivência dos rizóbios uma vez inoculados em sementes comerciais e submetidos à estocagem.

Uma alternativa promissora e recentemente explorada no Brasil é a mistura de inoculantes oficialmente recomendados para a soja com outras bactérias promotoras de crescimento ou bactérias associativas, uma técnica definida como coinoculação (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Esta metodologia vem sendo adotada por apresentar boa produtividade e resultados melhores que cada estirpe isolada. Além de contribuir para aumento da nodulação, ela tem um ótimo efeito no crescimento radicular e pode ser utilizado tanto na semente quanto no sulco de semeadura (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). A coinoculação é muito utilizada e estudada em outros países por apresentar uma ótima produtividade comparada à técnica padrão (ATIENO; HERRMANN; OKALEBO et al., 2012). Porém, apesar de a técnica apresentar altos rendimentos conforme os estudos observados acima, no Brasil ela ainda não é muito explorada.

A coinoculação na cultura da soja com uma mistura de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense* promoveu um aumento da produtividade de 11% comparado com inoculação padrão apenas com *Bradyrhizobium* (BÁRBARO; MACHADO; BÁRBARO, et al., 2009). Outro trabalho, realizado no Paraná, mostrou que a produtividade com tratamento de coinoculação (com *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense*) foi maior que a inoculação padrão com *Bradyrhizobium*. Na cidade de Londrina, na safra de 2010/11, a cultura da soja teve um aumento de 243 kg ha<sup>-1</sup>, e na cidade de Ponta Grossa teve-se aumento de 167 kg ha<sup>-1</sup> pelo uso da coinoculação (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Segundo estudo de Mazzuchelli et al. (2014), realizado na cidade de Alvorada do Sul-PR, a coinoculação com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium* spp. promoveu um incremento de 33,96% na nodulação comparado a inoculação apenas com *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Segundo este trabalho, para a realização da coinoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense*, o agricultor gasta em torno de quinze reais por hectare, porém eleva a produtividade 16% a mais sobre a média nacional (3.000 kg ha<sup>-1</sup>), totalizando um aumento de 480 kg de soja, ou 8 sacos (ARAUJO, 2014). A utilização da coinoculação, segundo os estudos desenvolvidos, garante um aumento na produtividade e pode ser usada para aumentar a renda do agricultor. O objetivo deste trabalho foi testar o uso de diferentes técnicas de inoculação de sementes sobre o crescimento, nodulação e produtividade na cultura da soja.

Neste estudo, foram testadas as seguintes hipóteses

- A inoculação padrão em conjunto com um aditivo apresentará melhores índices de nodulação e produtividade que a inoculação padrão sem uso de aditivo.
- A inoculação no sulco de semeadura proporcionará produtividade igual ou maior à inoculação tradicional de sementes.
- As sementes de soja, quando inoculadas em conjunto com um aditivo, poderão ser armazenadas por um período maior que 24 horas sem que ocorra diminuição de nodulação ou perdas de produtividade.

- A inoculação de sementes de soja tratadas, com uma mistura de dois ou mais inoculantes aumenta a nodulação nas raízes e a produtividade, quando comparado ao uso de um único inoculante.

- O uso da inoculação após a emergência das plantas pode ser utilizada garantindo maior nodulação e produtividade que a inoculação padrão realizada nas sementes.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi resultante de um projeto estabelecido em cooperação entre a UFSC, Total Biotecnologia (Curitiba, PR) e Cultivar Insumos Agrícolas e Cereais (Curitibanos, SC).

O experimento foi desenvolvido na safra 2014/2015 em Ponte Alta do Norte – SC na localidade Rio dos Cachorros, entre as coordenadas geográficas de 27°23'36,37" de latitude Sul e 50°28'19,91" de longitude oeste, em uma altitude de 959 metros. A área foi disponibilizada pela empresa Cultivar, de Curitibanos - SC. Na área de estudo nunca foi realizado o cultivo de nenhuma espécie agrícola, havendo apenas campo nativo como cobertura do solo. O solo é caracterizado como Cambissolo Húmico e as características químicas estão dispostas na Tabela 1. Foi feita a interpretação e posteriormente aplicado três meses antes da semeadura 5 ton ha<sup>-1</sup> de calcário e dez dias antes 300 kg ha<sup>-1</sup> de NPK (2-20-20). Além disto, amostras de solo foram enviadas para a EMBRAPA Soja (Londrina, PR) para que fosse realizada análise de Número Mais Provável (NMP) para determinar-se a presença de rizóbios no solo. O resultado apontou a ocorrência de 3x10<sup>3</sup> UFC bactérias g<sup>-1</sup> de solo (Figura 3; Anexo).

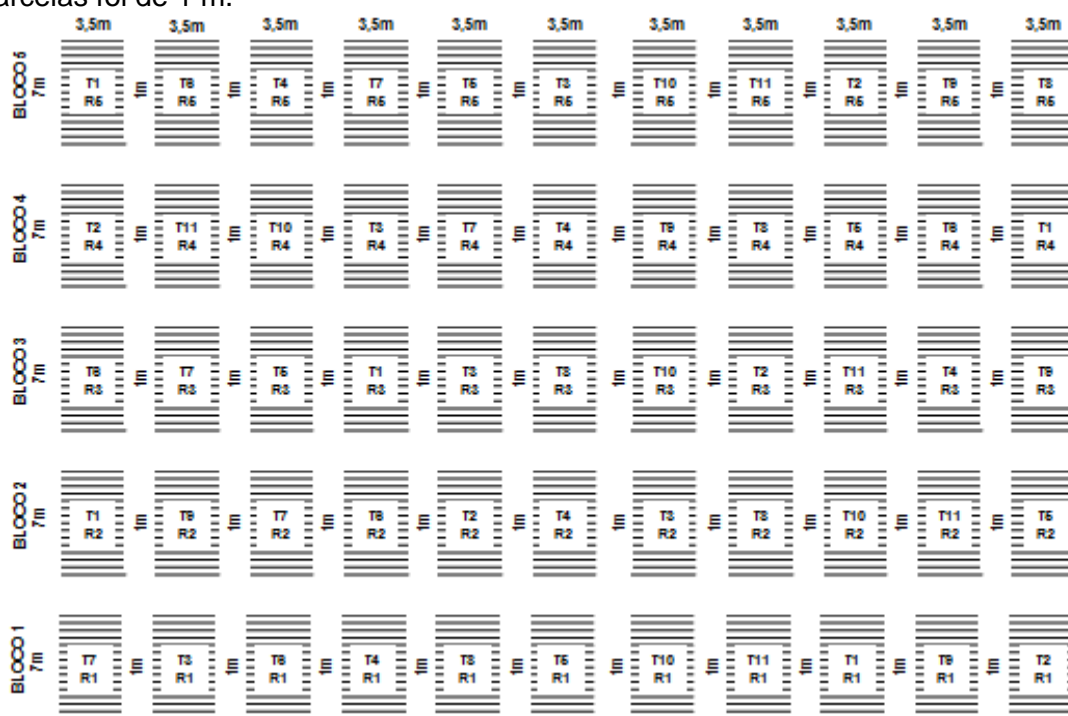
**Tabela 1.** Caracterização dos resultados da análise química do solo da área de estudo.

Atributo	Valor
pH	5,5
Ca (coml <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,39
Mg (coml <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,24
Al (coml <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,42
H + Al (coml <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	7,20
K (coml <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,09
P (mg dm <sup>-3</sup> )	5,64
MO (g dm <sup>-3</sup> )	20,35
CTC ph 7,0 (coml <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	7,92
SB (coml <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,72
V (%)	9,09

O experimento foi realizado em um delineamento em blocos ao acaso, com cinco repetições. Cada repetição constituiu de uma parcela de 3,5m por 7,0m como pode ser observado na Figura 1. A semeadura foi realizada manualmente com espaçamento de 0,5 m entre linhas com 12 a 14 sementes

por metro. A área útil de cada parcela totalizou  $24,5\text{m}^2$  e a variedade de soja utilizada foi a NA 5909 RG (Nidera). A cultivar apresenta um ciclo super precoce e habito de crescimento indeterminado, possui também uma alta resistência a doenças. Todas as sementes utilizadas foram previamente tratadas com fungicida e inseticidas.

**Figura 1.** Croqui demonstrativo da área que o experimento foi realizado. O experimento contou com 5 repetições, representadas pelos blocos. Cada repetição continha 11 tratamentos que foram distribuídos aleatoriamente. O espaçamento entre parcelas foi de 1 m.



Todos os inoculantes foram fornecidos pela empresa Total Biotecnologia Indústria e Comércio Ltda, com sede no município de Curitiba - PR. Os tratamentos testados foram:

Tratamento 1 (Testemunha) as sementes não receberam inoculante nem adubação nitrogenada.

O tratamento 2 (Adubação nitrogenada) as sementes não foram inoculadas, porém o solo recebeu adubação nitrogenada na dosagem de  $200\text{kg de N ha}^{-1}$ . A aplicação foi feita a lanço, utilizando o produto comercial SuperN<sup>®</sup>, onde foram parceladas em dose de 50% na semeadura e 50% aos 32 dias após emergência (período V6).

No tratamento 3 (Inoculação padrão) foi realizado no dia do plantio. As sementes foram inicialmente umedecidas com água açucarada (10%) na dose de 6mL/kg antes de o inoculante ser aplicado. Foi utilizado inoculante turfoso comercial Total Nitro Ultra, composto por bactérias do gênero *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5079 e 5080 ( $5,5 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) na dosagem de 1,53g por kg de semente, que resultou na concentração de 1.200.000 UFC por semente.

No tratamento 4 (Inoculante turfoso com aditivo) as sementes foram umedecidas com água na dose de 4mL kg<sup>-1</sup> de sementes. Posteriormente foi adicionada às sementes uma mistura de inoculante turfoso (6g/kg por semente) com aditivo Lastro (9mL kg<sup>-1</sup> de semente). O inoculante aplicado foi o Total Lastro turfoso, composto por bactérias do gênero *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5079 e 5080 na concentração de  $5,5 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. A dose adotada resultou em uma concentração de 1.200.000 UFC por semente.

O tratamento 5 (Coinoculação na semeadura) foi realizado no dia do plantio. Foi utilizado o aditivo Protege Max (1mL kg<sup>-1</sup> de sementes). Além do aditivo, foi utilizado um pacote comercial de coinoculação para soja composto por bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA 5079 e 5080) e *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6). Os produtos usados foram os inoculantes Total Nitro Max ( $7 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) na dose de 2mL kg<sup>-1</sup> de semente que resultou na concentração de 2.000.000 UFC por semente, e o inoculante líquido Azo Total Max ( $7 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) na dose de 2mL kg<sup>-1</sup> de semente, que resultou na concentração de 2.000.000 UFC por semente. Todos os produtos foram misturados e em seguida homogeneizados com as sementes no momento do plantio.

O tratamento 6 (Coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 2 inoculantes) foi realizado no dia do plantio. Nele, foi feita a pulverização de uma mistura de inoculantes no sulco de semeadura. Os inoculantes utilizados foram Total Nitro Max ( $7 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) na dose de 300 mL ha<sup>-1</sup> e o inoculante líquido Azo Total Max ( $7 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) na dose de 300 mL ha<sup>-1</sup>. Neste tratamento também foi utilizado o aditivo Protege Max (150 mL ha<sup>-1</sup>). Os produtos foram misturados com água (199,25 L ha<sup>-1</sup>). Em seguida, a mistura foi aplicada no sulco de semeadura através de pulverizador manual de compressão.

O tratamento 7 (Coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 3 inoculantes) foi efetuado no dia do plantio. Foi aplicado um pacote de coinoculação composto pelos inoculantes Total Nitro Max, Azo TotalPF e o *Bacillus subtilis*. O inoculante Total Nitro Max ( $7 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) foi aplicado uma dose de 300 mL ha<sup>-1</sup>, o inoculante líquido com *Pseudomonas fluorescens* ( $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) foi aplicado uma dose de 300 mL ha<sup>-1</sup> e o inoculante líquido com *Bacillus subtilis* ( $1 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>) na dose de 100 mL ha<sup>-1</sup>. Foi utilizado também o aditivo Protege Max (150mL ha<sup>-1</sup>). Todos os produtos foram diluídos em água (199,15L ha<sup>-1</sup>) e pulverizados no sulco de semeadura com pulverizador manual de compressão.

O tratamento 8 (Inoculação em pulverização pós-emergência) foi realizado no estágio V1. Aplicou-se uma mistura dos inoculantes Total Nitro (1L ha<sup>-1</sup>) e Brady Spray (200mL ha<sup>-1</sup>) diluídos em água (198,8L ha<sup>-1</sup>). O inoculante Total Nitro líquido é composto por bactérias do gênero *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5079 e SEMIA 5080 na concentração de  $5 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. Posteriormente a mistura foi pulverizada sobre a linha de semeadura.

No tratamento 9 (Inoculação 2 dias pré-semeadura com aditivo), as sementes foram inicialmente homogeneizadas com o aditivo Cronos A (1mL kg<sup>-1</sup> de semente). Posteriormente, foi acrescentada uma mistura do inoculante Total Nitro Soja (2mL kg<sup>-1</sup> de semente) com aditivo Cronos B (1mL kg<sup>-1</sup> de semente). O inoculante aplicado foi o Total Nitro Soja líquido, que é composto por bactérias do gênero *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5079 e SEMIA 5080 na concentração de  $7 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. A dose adotada resultou na concentração de 2.000.000 UFC por semente. Em seguida, as sementes foram estocadas em local seco e arejado, até a data do plantio.

O tratamento 10 (Inoculação 7 dias pré-semeadura com aditivo) constituiu da aplicação de uma mistura composta do inoculante Total Nitro Max (2mL kg<sup>-1</sup> de sementes), com o aditivo Cronos Nod (2mL kg<sup>-1</sup> de sementes). O inoculante aplicado foi o Total Nitro Max líquido, composto por bactérias do gênero *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) na concentração de  $7 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. A dose adotada resultou na concentração de 2.000.000 UFC por semente. Após feita a inoculação, as sementes foram acondicionadas em local seco e arejado, até o plantio.

No tratamento 11 (Inoculação 30 dias pré-semeadura com aditivo), foi inicialmente aplicado o aditivo Cronos TSI na dose de  $6\text{mL kg}^{-1}$  de semente. Em seguida, aplicou-se o inoculante turfoso Cronos TSI ( $5\text{g kg}^{-1}$  de sementes). Posteriormente, as sementes foram armazenadas em local seco e arejadas, até a data da semeadura.

Para os tratamentos fitossanitários foram realizadas duas aplicação de fungicidas com os produtos comerciais Carbendazim<sup>R</sup> (Principio Ativo: Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate) e Piori<sup>R</sup> (Principio Ativo: Azoxistrubina – Ciproconazol) e duas aplicações com inseticidas conhecidos comercialmente Trinca Caps<sup>R</sup> (Principio Ativo: Lambda-Cialotrina) e Acefato<sup>R</sup> (Principio Ativo: O,S-dimethyl acetylphosphoramidothioate). Além disso, foi realizada uma aplicação de herbicida com o produto comercial Glifosato (Principio Ativo: Sal isopropalamina de N-(phosphonomethyl)glicine) que totalizaram cinco aplicações durante todo o ciclo da cultura da soja (desde o semeadura até colheita). As aplicações foram realizadas pela empresa Cultivar Distribuidora de Insumos Agrícolas Ltda.

Aos 32 dias após a emergência foi realizada a primeira coleta para avaliar os nódulos presentes nas raízes e a massa seca da parte aérea das plantas. Foram retiradas cinco plantas da segunda linha após a bordadura de cada parcela. A coleta foi feita com uma pá de corte, para auxiliar a retirada das plantas sem danificar as raízes. As raízes foram retiradas até a profundidade de 0,2 m e um diâmetro de 0,15 m ao redor da coroa. As plantas foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao Laboratório de Microbiologia da UFSC Campus Curitibanos.

No laboratório, as raízes foram separadas da parte aérea cortando-se a planta no ponto de inserção dos cotilédones. A parte aérea foi acomodada em sacos de papel pardo e levada a estufa de circulação forçada com temperatura média de  $65^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente foi feita a pesagem da massa de matéria seca da parte aérea (g/planta), em balança semi-analítica.

Em seguida, o sistema radicular foi visualmente dividido em duas regiões: raiz principal (compreendendo a coroa até uma distância de 1,5cm) e raízes secundárias. Em cada uma delas, foram feitas as seguintes determinações: número total de nódulos, número e viabilidade de nódulos maiores que 2 mm.

As raízes foram lavadas e os nódulos retirados para contagem, o processo ocorreu em duas etapas. Primeiramente, os nódulos da raiz principal foram separados e contados. Após a contagem, os nódulos passaram em uma peneira de malha de 2 mm. Os nódulos que ficaram retidos foram contados e abertos para analisar a sua viabilidade, através da observação da coloração. A cor rosa avermelhada era sinal de nódulo viável. Assim, determinou-se o número de nódulos viáveis. Todos os nódulos, tanto os maiores quanto os menores que 2 mm, foram acomodados em sacos de papel pardo e levados para a estufa de circulação forçada com temperatura média de 65°C até peso constante. Em seguida a massa de matéria seca de nódulos (g/planta) foi determinada em balança analítica. O mesmo procedimento foi realizado para os nódulos extraídos do restante do sistema radicular (distância maior que 1,5cm da coroa da raiz principal). Após finalizado o processo da coleta de nódulos, as raízes foram descartadas.

Uma segunda coleta foi realizada no período de florescimento pleno (R2). Foram feitas as mesmas avaliações da primeira coleta, com exceção da pesagem da parte aérea.

A avaliação de produtividade de grãos foi realizada na maturação plena das plantas (R8), onde, foram retiradas manualmente todas as plantas presentes em 8 metros de linha de cada parcela. As plantas retiradas foram contadas, e posteriormente, submetidas à trilhagem para separar a parte vegetativa dos grãos. A parte vegetativa foi descartada e os grãos foram limpos. Por fim, foi feita a determinação da umidade e a produtividade foi estimada em  $\text{Kg ha}^{-1}$ , com correção de umidade para 13%.

Os dados de nodulação foram submetidos a teste estatístico não paramétrico Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ), pois não apresentaram distribuição normal. Os valores de produtividade foram submetidos ao teste de normalidade e posterior análise de variância (ANAVA), como separação de médias pelo Teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). Todos os testes foram realizados com o auxílio do programa Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2009).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 NODULAÇÃO DE RAÍZES AOS 32 DAE

Aos 32 DAE, as médias das três variáveis de nodulação da raiz principal foram superiores no tratamento com inoculante turfoso e aditivo (T4) em relação a inoculação padrão, T3 (Tabela 2). Na raiz secundária, as médias de todas as variáveis analisadas foram superiores em ambos os tratamentos de coinoculação em pulverização no sulco de semeadura (T6 e T7) quando comparadas com as médias do tratamento com inoculação padrão (Tabela 2).

Não existem outros registros literários que avaliem estas variáveis tanto em raiz principal ou secundária. Assim, observa-se que no período inicial de desenvolvimento das plantas (32 DAE) as raízes principais tiveram melhores resultados de nodulação no tratamento com inoculante turfoso e aditivo. Isto pode ser explicado pelo fato em que o inoculante foi aplicado diretamente nas sementes, assim, conforme as primeiras raízes estavam sendo emitidas, foram se formando os nódulos. Além disso, o fato do inoculante turfoso não ser tão volátil em comparação com o líquido pode contribuir permanecendo por mais tempo e com uma maior estabilidade no solo (RONSANI; PINHEIRO; PURIN, 2013). Já o aditivo age como um protetor às bactérias presentes no inoculante, com função de sustentar a viabilidade bacteriana, e protegê-las do efeito tóxico dos produtos usados no tratamento de sementes. Esta inoculação é, de certa maneira, benéfica ao arranque inicial para o desenvolvimento da cultura.

Já para as raízes secundárias, os tratamentos de coinoculação em pulverização promoveram melhor nodulação. Isto pode ser explicado, devido os inoculantes e as raízes que estão sendo formado, terem o primeiro contato com as bactérias apenas no solo e não ao redor das raízes. Assim sendo, as bactérias não tem contato com as sementes as quais são tratadas e podem apresentar efeito tóxico e vir afetá-las (EMBRAPA, 2004). Outra característica ligada aos valores superiores apresentados nas variáveis da raiz secundária é o fato de que na coinoculação são observados resultados melhores que cada estirpe isolada, contribuindo diretamente com um ótimo efeito na nodulação (BÁRBARO; MACHADO; BÁRBARO, et al., 2009).

**Tabela 2.** Efeito de diferentes tratamentos de inoculação da soja sobre o numero de nódulos, nódulos maiores que 2mm, nódulos viáveis presentes nas raízes principal e secundárias, numero de nódulos por planta, massa seca de nódulos por planta, e massa da parte aérea, aos 32 dias após a emergência (estádio V6).

Tratamento	Nódulos na raiz principal			Nódulos na raiz Secundária			Número total de nódulos por planta	Massa seca de nódulos (mg)	Massa seca parte área (g)
	Número total	Maior que 2mm	Viáveis	Número total	Maiores que 2mm	Viáveis			
T1	0 a*	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	5,33 a
T2	0,04 a	0,04 a	0,04 a	0 a	0 a	0 a	0,04 a	2 a	5,40 a
T3	1,52 abc	1,4 ab	1,4 ab	0,24 ab	0,24 ab	0,24 ab	1,76 ab	25 abc	5,19 a
T4	6,12 d	6,08 c	6,08 c	0,76 bc	0,76 bc	0,76 bc	6,88 c	143 d	5,21 a
T5	0,04 a	0,04 a	0,04 a	0,2 ab	0,2 ab	0,2 ab	0,24 ab	9 ab	5,32 a
T6	4,08 cd	3,64 b	3,6 b	3,84 c	2,68 c	2,64 c	7,92 c	87 cd	4,94 a
T7	2,48 abc	2,48 ab	2,48 ab	4,88 c	4,64 c	4,64 c	7,36 c	101 d	4,79 a
T8	1,92 bc	1,72 b	1,68 b	2,28 abc	2,28 abc	2,28 abc	4,2 bc	69 bcd	5,66 a
T9	0,12 ab	0,12 ab	0,12 ab	0,2 ab	0,2 ab	0,2 ab	0,32 ab	12 ab	5,43 a
T10	0,08 a	0,08 a	0,08 a	0 a	0 a	0 a	0,08 a	2 a	6,76 a
T11	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,20 ab	0,20 ab	0,20 ab	0,20 a	12 ab	5,91 a

\* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo Teste Kruskal Wallis (5% de probabilidade). Os tratamentos utilizados foram T1=Testemunha, T2=Adubação nitrogenada, T3=Inoculação Padrão, T4=) Inoculante turfoso com aditivo, T5= Coinoculação na semeadura, T6= Coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 2 inoculantes, T7= Coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 3 inoculantes, T8= Inoculação em pulverização pós emergência, T9= Inoculação 2 dias pré-semeadura com aditivo, T10= Inoculação 7 dias pré-semeadura com aditivo e T11= Inoculação 30 dias pré-semeadura com aditivo.



O tratamento de coinoculação na semeadura (T5) apresentou valores iguais a inoculação padrão com *Bradyrhizobium diazoefficiens*, e os tratamentos de coinoculação em pulverização (T6 e T7) apresentaram resultado superior ao padrão. Assim evidencia-se que o tratamento de coinoculação em pulverização teve melhores rendimentos de nodulação e produtividade em virtude dos inoculantes não terem contato direto com as sementes tratadas, fato não observado quando a inoculação é feita direto nas sementes. Outro fato associado é que quando a inoculação é pulverizado ele tem contato direto com o solo, não passando por processos de mistura entre o inoculante e as sementes, que é o caso da inoculação de sementes padrão. A aplicação do inculante na semente pode ser realizada de forma inadequada afetando a viabilidade das bactérias. Outro fator que pode interferir na viabilidade é o período entre a inoculação e a semeadura o qual deve ser respeitado. Desta maneira, a inoculação de sementes pode estar sujeita a erros, que na inoculação em pulverização são minimizados garantindo bons rendimentos.

Os valores do número total de nódulos observados nos tratamentos 4, 6 e 7 foram superiores quando comparados aos valores do tratamento 3. Resultados semelhantes a este já foram registrados, como no trabalho de Zilli et al. (2011). Nele, os autores observaram que o número de nódulos foi maior quando o inoculante foi aplicado diretamente no sulco de semeadura. Porém, este bom rendimento foi resultado da aplicação de apenas um inoculante no sulco de semeadura, enquanto no presente trabalho foi utilizada uma mistura de dois ou três inoculantes. Assim, sabendo-se que a inoculação em pulverização apresenta bom rendimento, ela é uma ótima alternativa para ser associada à coinoculação. Esta prática ainda pode ser realizada com um pacote de coinoculação que resulta em ótimos rendimentos. Segundo os relatos de Hungria et al. (2013), observou-se um aumento de produtividade de 243 e 167kg ha<sup>-1</sup> em duas cidades do Paraná respectivamente; Mazzuchelli et al. (2014) realizou um experimento na cidade de Alvorada do Sul no Paraná, onde observou, um aumento médio de 34% de nodulação no tratamento de coinoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Bacillus subtilis*, incremento de 21,48% na inoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens*, quando

comparado com o controle sem inoculação; Em outro estudo realizado por Munhoz et al. (2014), o número total de nódulos por planta aos 32 DAE foi maior em cinco tratamentos quando comparado ao padrão, sendo que o tratamento de coinoculação aos 10 dias pré-semeadura sobressaiu-se entre os demais. O tratamento resultou em 2,38 nódulos por planta e o tratamento padrão obteve-se valores médios de 1,08. Com isso pode-se ver que o tratamento de coinoculação obteve um aumento médio de 120% a mais quando comparado ao tratamento padrão com um inoculante isolado. Tais informações podem ser confirmadas nos resultados apresentados neste trabalho, onde, a inoculação em pulverização com mais de um inoculante, ou seja, coinoculação (T6 e T7), promoveu média superior quando comparada ao tratamento padrão (T3).

As médias da variável massa seca de nódulos foram superiores nos tratamentos 4 e 7 em comparação com a inoculação padrão (tratamento 3). A massa seca dos nódulos foi aumentada de 25 para 143 e 101 mg respectivamente, nos tratamentos 4 e 7 (Tabela 2).

Já existem outros estudos semelhantes avaliando-se a massa seca de nódulos em função de tratamentos semelhantes aos estudados neste experimento. No trabalho de Ronsani et al. (2013), avaliou-se o efeito de alguns tratamentos de inoculação de soja sobre a massa seca de nódulos aos 32 DAE. A média do tratamento de inoculação com inoculante líquido em pulverização no sulco de semeadura foi superior quando comparada com a testemunha (sem inoculante). Já no trabalho de Bárbaro et al. (2009) foram testados um tratamento de inoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens* (padrão) e dois tratamentos de coinoculação, sendo uma mistura de *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense*, onde um deles foi com *Azospirillum brasilense* líquido e no outro turfoso. As médias dos tratamentos testados não se deferiram estatisticamente, variando de 92,5 a 107,5 mg por planta. Assim, percebe-se que a massa seca pode sofrer incremento significativo em função do produto testado. Assim sendo, tratamentos que incluam práticas de pulverização e o uso de inoculantes turfosos podem ser técnicas que resultem em bons percentuais de aumento na massa seca de nódulos.

### 3.2 MASSA DE MATÉRIA SECA DA PARTE AÉREA

Todas as médias de massa de matéria seca da parte aérea dos tratamentos estudados foram estatisticamente iguais entre si (Tabela 2). Outros estudos realizados apresentaram resultados semelhantes aos observados no presente trabalho: Os valores encontrados não foram afetados por diferentes tratamentos de inoculação, coinoculação e com adubação mineral de nitrogênio.

No estudo de Bárbaro et al. (2009), a massa seca da parte aérea não deferiu entre os tratamentos com adubação nitrogenada, inoculação, coinoculação e o controle (sem inoculação e adubação nitrogenada). Outro estudo realizado por Molla et al. (2001), mostrou que massa seca da parte aérea das plantas de soja não diferenciou-se entre os diferentes tratamentos de inoculação e coinoculação. No trabalho realizado por Galal (1997), as médias do tratamento de inoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens* e N mineral e do tratamento de coinoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Azospirillum brasilense* e N mineral não foram estatisticamente diferentes.

De acordo com os trabalhos citados e neste estudo, pode-se observar que a massa seca da parte aérea das plantas não é afetada por diferentes tratamentos de fornecimento de nitrogênio, sendo estes através de nitrogênio mineral ou métodos de inoculação.

### 3.3 NODULAÇÃO DE RAÍZES NO ESTÁDIO R2

No período R2, observou-se que no tratamento 7, as médias das três variáveis de nodulação da raiz principal foram superiores ao tratamento 3. As médias de número total de nódulos foram aumentadas de 2,52 para 8,36 (232% de aumento). Já o número de nódulos maiores que 2 mm e nódulos viáveis passou de 2,52 para 3,28 (30% de aumento; Tabela 3). Os valores das três variáveis observados no tratamento de coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 3 inoculantes foram superiores quando comparados ao tratamento de inoculação padrão. Além disso, o número total de nódulos no tratamento 8 também foi superior ao observado no tratamento de inoculação padrão, T3 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito de diferentes tratamentos de inoculação da soja sobre o número de nódulos, nódulos maiores que 2 mm, nódulos viáveis presentes nas raízes principal e secundárias, número de nódulos por planta e massa seca de nódulos por planta no florescimento pleno (estádio R2).

Tratamento	Nódulos na raiz principal			Nódulos na raiz secundária			Número total de nódulos por planta	Massa seca nódulos (mg)
	Número total	Maior que 2mm	Viáveis	Número total	Maiores que 2mm	Viáveis		
T1	1 ab	0,24 ab	0,24 ab	2,84 ab	0,2 a	0,2 a	3,84 ab	12 a
T2	0,04 a	0,04 a	0,04 a	0 a	0 a	0 a	0,04 a	4 a
T3	2,52 ab	2,52 abc	2,52 abc	0 a	0 a	0 a	2,52 ab	79 a
T4	3,6 bcd	3,6 bcd	3,6 bcd	0,32 abc	0,32 ab	0,32 ab	3,92 bc	171 a
T5	0,76 ab	0,36 ab	0,36 ab	0,32 ab	0,04 a	0,04 a	1,08 ab	20 a
T6	0,44 a	1,8 a	1,64 a	9,08 c	4,2 b	3,88 b	9,52 bc	147 a
T7	8,36 d	3,28 d	3,28 d	3abc	1,76 ab	1,76 ab	11,36 c	213 a
T8	8,4 cd	3,36 cd	3,36 cd	9,88 bc	1,6 ab	1,6 ab	18,28 c	204 a
T9	0,04 a	0,04 a	0,04 a	0,48 abc	0,36 ab	0,36 ab	0,52 ab	23 a
T10	1,08 abc	0,68 abcd	0,68 abcd	0 a	0 a	0 a	1,08 ab	46 a
T11	0,8 ab	0,76 ab	0,76 ab	0,08 a	0,08 a	0,08 a	0,88 ab	46 a

\* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Kruskal Wallis (5% de probabilidade). Os tratamentos utilizados foram T1=Testemunha, T2=Adubação nitrogenada, T3=Inoculação Padrão, T4=) Inoculante turfoso com aditivo, T5= Coinoculação na semeadura, T6= Coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 2 inoculantes, T7= Coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 3 inoculantes, T8= Inoculação em pulverização pós emergência, T9= Inoculação 2 dias pré-semeadura com aditivo, T10= Inoculação 7 dias pré-semeadura com aditivo e T11= Inoculação 30 dias pré-semeadura com aditivo.

Até o âmbito deste estudo, não há trabalhos que relatem dados sobre a nodulação na raiz principal neste estágio de desenvolvimento. Apesar disso, pode-se observar que, para as variáveis de nodulação citadas, o tratamento de coinoculação com 3 inoculantes teve melhor desempenho quando comparado ao tratamento de inoculação padrão, podendo ser uma ótima alternativa para o fornecimento de nitrogênio através da raiz principal. Este resultado é, provavelmente, oriundo da técnica de coinoculação, que contribui no aumento da nodulação e no crescimento radicular (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Na cultura da soja a presença do *Bradyrhizobium diazoefficiens* tem como função de fixação biológica de nitrogênio fazendo assim o fornecimento de nitrogênio para a planta. Outros microrganismos como *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* podem atuar de forma associativa com a planta. Eles promovem crescimento da planta devido a processos como a produção de hormônios de crescimento, capacidade de solubilizar fosfato, indução de resistência sistêmica a doenças e estresse ambientais (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Um dos principais processos é a solubilização de fosfato, que promove benefícios para a fixação biológica de nitrogênio, uma vez que o fosfato é um dos constituintes de ATP, e o ATP por sua vez é caracterizado como a energia necessária para o processo de fixação biológica de nitrogênio (MARRA, 2009). Para cada molécula de  $N_2$  fixada, são necessários 16 ATPs, o que representa um custo energético elevado (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Assim, o maior aporte de P pelas bactérias solubilizadoras pode contribuir para maior fixação de N e, conseqüentemente, maior nodulação.

Além disso, o conjunto de diferentes bactérias tem um efeito sinérgico com resposta positiva entre bactérias simbióticas (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e diazotróficas (*Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense*), resultando na potencialização da nodulação e maior crescimento radicular. Com o crescimento radicular é potencializando a nodulação que é realizada por bactérias simbióticas. Além disso, bactérias diazotróficas induzem a produção de genes para que ocorra a nodulação (BÁRBARO; MACHADO; BÁRBARO, et al., 2009). Com isso, pode-se afirmar que a coinoculação com 3 inoculantes apresenta ótimos desempenhos quando comparado ao tratamento de inoculação padrão com a utilização de uma bactéria isolada.

Nas raízes secundárias, o número total de nódulos dos tratamentos 6 e 8 foi maior que no tratamento 3 (Tabela 3). Não existem registros de outros trabalhos que avaliem esta variável para as raízes secundárias. Porém, com este estudo pode-se observar que o tratamento de coinoculação em pulverização apresentou resultados melhores quando comparados com o padrão. Este resultado pode estar ligado ao fato de que, quando o tratamento de inoculação é pulverizado, o inoculante só irá ter contato com as raízes no solo, evitando assim efeito tóxico do tratamento de sementes (EMBRAPA, 2004).

O tratamento de inoculação em pós-emergência também apresentou valores superiores que o tratamento tradicionalmente utilizado no país. Esta inoculação é caracterizada por pulverizar o inoculante na linha onde as plantas já estão em seu estágio vegetativo. A técnica promoveu bons rendimentos de nodulação, onde foram iguais ou superiores que na inoculação padrão. Em estudo realizado por Zilli et al. (2008) foram testados tratamentos de inoculação padrão e após-emergência. A inoculação após-emergência foi realizada 18 DAE e apresentou a maior parte de nódulos nas raízes secundárias logo abaixo da superfície do solo. O autor observou que a inoculação padrão proporcionou um valor médio de 30 nódulos por planta, enquanto a inoculação após emergência obteve um valor médio de 14,6 nódulos por planta. A inoculação padrão teve valores médios superiores ao tratamento após emergência, diferentemente do que foi visto neste experimento onde a inoculação após emergência foi superior a padrão. Com tudo, a inoculação após emergência pode ser uma técnica, a ser recorrida caso aconteça a morte bacteriana após as sementes já estarem plantadas (ZILLI; MARSON; GIANLUPPI, et al., 2008).

O número de nódulos maiores que 2 mm e os viáveis foram superiores no tratamento de coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 2 inoculantes (Tratamento 6) quando comparado com a inoculação padrão (tratamento 3). O número de nódulos maiores que 2 mm e os nódulos viáveis foram aumentados de 0 para 4,2 e 3,9 respectivamente (Tabela 3).

Apesar de não haver outros relatos sobre estas variáveis pode-se observar que, como citado no paragrafo anterior, a pulverização contribui para este resultado. Além das bactérias se estabelecerem facilmente no solo quando pulverizada, o fato dos nódulos se apresentarem maiores e viáveis é decorrente do tratamento de coinoculação com 2 inoculantes (VIERA NETO; PIRES; MENEZES, et al., 2008). Este conjunto destas bactérias tem um efeito positivo o qual potencializa a nodulação devido as *Bradyrhizobium diazoefficiens* que tem efeito de nodulação e assim fixação biológica de nitrogênio e, além disso, conta com bactérias do gênero *Azospirillum brasilense* que agem na indução para que ocorra a produção de genes de nodulação (BÁRBARO; MACHADO; BÁRBARO, et al., 2009). O fato dos nódulos estarem concentrados nas raízes secundária é ligado diretamente ao fato do inoculante ser pulverizado. Desta maneira, o inoculante fica disposto no sulco de semeadura, no qual posteriormente é colocada a semente. Então, conforme a semente inicia o processo fisiológico e assim o desenvolvimento de raízes no solo, as raízes vão se conectando às bactérias que ali estão presentes. Além disso, outro fato é decorrente das bactérias *Azospirillum brasilense*, que são associativas com a planta, fazendo com que ela tem um melhor crescimento (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAÚJO, 2013).

Os benefícios da coinoculação já foram demonstrados para outras culturas tais como feijão-Caupi e leucena (ARAÚJO; CARNEIRO; BEZERRA, et al., 2009). Neste estudo, os autores avaliaram um tratamento de coinoculação com *Bradyrhizobium*, *Bacillus subtilis*, mais potássio e fosforo, e um tratamento de inoculação padrão com *Bradyrhizobium*, mais potássio e fosforo. Pode-se observar que o tratamento de coinoculação resultou em valores médios de 44 e 113 nódulos por planta, para as culturas de feijão e leucena respectivamente, enquanto o tratamento padrão mostrou valores médios de 20 e 96 nódulos por planta respectivamente para as culturas de feijão e leucena (ARAÚJO; CARNEIRO; BEZERRA, et al., 2009).

Em outro estudo realizado por Munhoz et al. (2014), o número total de nódulos por planta no estágio R2 foi maior em três tratamentos quando comparado ao padrão. Os tratamentos que foram superiores tem em comum serem pré-inoculados alguns dias antes da semeadura. Dentre estes, pode-se

observar que o tratamento de coinoculação aos 10 dias pré-semeadura com aditivo resultou em 20 nódulos por planta, enquanto o tratamento padrão avaliou-se valores médios de 11 nódulos. Desta maneira, pode-se observar que o tratamento de coinoculação foi superior ao padrão e teve um aumento médio de 88% na nodulação. Os referidos estudos não apresentam variáveis ou a cultura compatível a do presente trabalho, porém apresentam valores de nodulação e o benefício que a coinoculação apresenta em relação às leguminosas. Portanto, o tratamento de coinoculação é uma técnica que pode garantir que a nodulação apresente bons rendimentos, tanto de quantidade como de qualidade (tanto nódulos viáveis como maiores que 2 mm).

Em relação ao número total de nódulos por planta, os tratamentos 7 e 8 foram os que resultaram em médias superiores comparadas ao tratamento 3. No tratamento de inoculação padrão, obteve-se uma média de 2,52 nódulos por planta, valor inferior quando comparado ao registrado nos tratamentos 7 e 8, que resultaram em médias de 11,36 e 18,28 nódulos por planta, respectivamente (Tabela 3). Resultados semelhantes aos obtidos neste experimento já foram encontrados em outros trabalhos.

Em estudo realizado por Afzal et al. (2010), os autores observaram que na inoculação padrão com *Bradyrhizobium* e adubação com  $P_2O_5$  houve um valor médio de 4,83 nódulos por planta. Já no tratamento de coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Pseudomonas* observou-se 9,30 nódulos por planta, resultando em um aumento médio de 190% de nódulos (AFZAL; BANO; FATIMA; 2010). Segundo estudo de Mazzuchelli et al. (2014), a coinoculação combinada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium spp.* proporcionou incrementos na nodulação de 36,96%, enquanto a inoculação com *Bradyrhizobium spp.* proporcionou aumento na nodulação de 21,48% a mais que a testemunha (sem inoculação e adubação nitrogenada).

Em outro estudo, avaliou-se a resposta de coinoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Pseudomonas sp.* no período de florescimento da planta (ARGAW, 2012). Nele, foram testados os tratamentos padrão (composto por adubação com ureia e superfosfato triplo) e dois tratamentos de coinoculação com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium diazoefficiens*. No tratamento padrão, foram observados 2 nódulos por planta, enquanto que nos



tratamentos de coinoculação, este número aumentou para 20 e 74,5 nódulos por planta com o uso das estirpes TAL-379 e TAL-378, respectivamente. Portanto, afirma-se que o número de nódulos por planta é aumentado com a utilização do pacote de coinoculação. Isto pode estar ligado ao fato do inoculante padrão para a cultura realizar a nodulação e os outros inoculantes utilizados agirem auxiliando no crescimento da planta (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). O uso das diferentes bactérias tem efeito sinérgico sobre as plantas, resultando na potencialização da nodulação e maior crescimento radicular (BÁRBARO; MACHADO; BÁRBARO, et al., 2009).

Estudos mostram que a coinoculação pode suprir toda a necessidade de N dispensando qualquer tipo de adubação. Segundo Campos (2014), a técnica pode fornecer 300 kg de N por hectare e estimular o crescimento da raiz pela ação do *Azospirillum*. Deste modo, a capacidade da planta absorver nutrientes e água é elevada, a qual proporciona maior resistência à seca, devido as raízes tenderem a alcançar profundidade maior no solo. O crescimento radicular pode ser atribuído à produção de um fitormônio (auxina), que estimula o alongamento das raízes. Com o crescimento das raízes, há uma tendência no aumento de nodulação, com isso estimulada a uma maior fixação biológica de nitrogênio pelo rizóbios, fornecendo nitrogênio a planta em maiores quantidades (CAMPOS, 2014). Assim a técnica de coinoculação é uma alternativa para o aumento do número de nódulos por planta.

Na segunda coleta de nodulação no estágio R2 pode-se observar que os tratamentos que tiveram melhores índices de nodulação não foram os mesmos apresentados na primeira coleta aos 32 DAE. Este fato pode estar associado que após a primeira coleta foi realizado um tratamento fitossanitário com o herbicida Glifosato, o qual pode ter interferido na nodulação em alguns tratamentos (CORREIA; MARCHETTI, 2013). Desta maneira os tratamentos com melhores resultados de nodulação na primeira coleta podem ter sofrido efeito direto do produto sobre a nodulação, cujo efeito de abortamento de nódulos já tem sido observado em condições de campo.

As médias da massa seca de nódulos de todos os tratamentos foram estatisticamente iguais (Tabela 3), aspecto confirmado em outros registros literários. Em estudo realizado por Groppa et al. (1998), a média de massa seca de nódulos no tratamento de inoculação padrão com *Bradyrhizobium*

*diazoefficiens* não diferiu estatisticamente quando comparada com o tratamento de coinoculação com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium diazoefficiens*. No trabalho de Atieno et al. (2012), foram avaliados os efeitos de diferentes tratamentos de inoculação sobre a nodulação de duas cultivares de soja. A média do tratamento de coinoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Bacillus subtilis* foi igual à da inoculação padrão com *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Estes trabalhos corroboram com os valores apresentados neste estudo, evidenciando que os diferentes tratamentos avaliados não sofreram efeitos significativos entre eles. Assim, pode-se ver que a massa seca de nódulos é uma variável que não é afetada por qualquer tratamento estudado no presente trabalho.

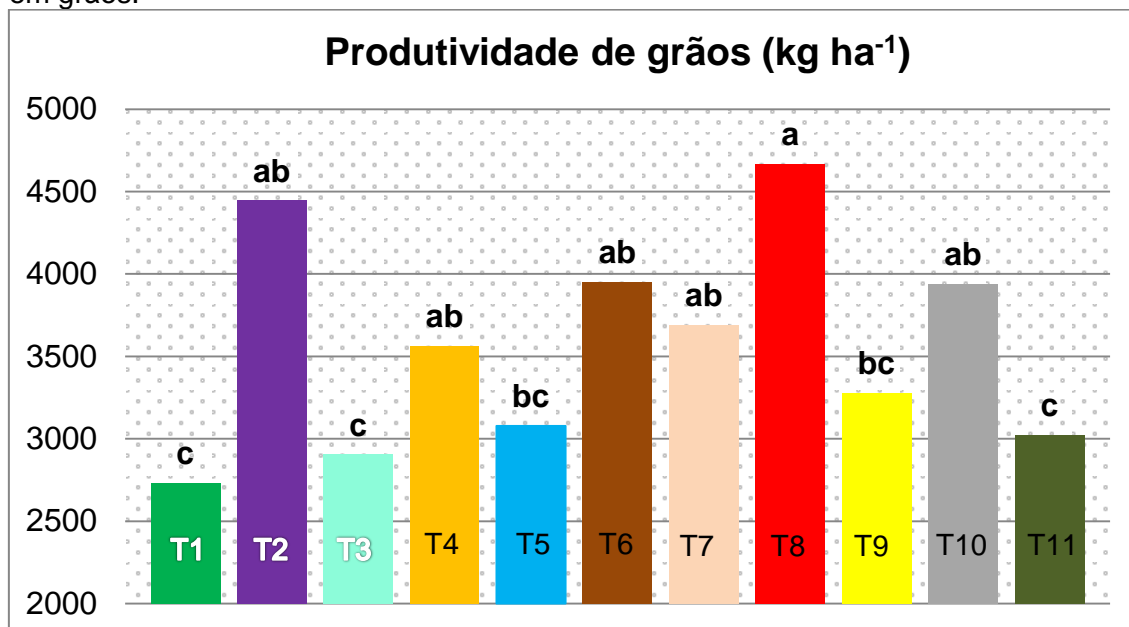
Apesar de os valores de massa seca de nódulos registrados no estágio R2 não se diferirem entre si estatisticamente, aos 32 DAE os tratamentos 4, 6 e 7 foram superiores ao padrão. Isto pode ser associado ao fato que aos 32 DAE a planta estava em seu desenvolvimento inicial e a formação de nódulos foi mais rápida nos três tratamentos citados. Mesmo mostrando a diferença nos valores da massa seca dos nódulos no início do desenvolvimento da cultura da soja (32 DAE), no estágio R2, que é o pico da nodulação da cultura, não foi detectada nenhuma diferença estatística. Porém, os tratamentos 4, 6 e 7 que tiveram diferença significativa no estágio 32 DAE, além do tratamento 8, apresentaram valores entre 0,147 a 0,213 g de massa seca de nódulos por planta no estágio R2. Os valores apresentados nestes tratamentos se adequam como ideais para garantir o fornecimento de N requerido pela cultura de soja. Segundo estudos, estes números devem estar entre 100 a 200 mg de nódulos secos por planta, característica observada nestes quatro tratamentos (ZILLI; SMIDERLE; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

### 3.4 PRODUTIVIDADE

As médias de produtividade dos tratamentos 1, 5, 9 e 11 foram iguais às do tratamento padrão, enquanto todos outros tratamentos apresentaram valores superiores ao tratamento 3 (Figura 1). Pode-se ressaltar o tratamento de inoculação em pulverização pós-emergência, que resultou em aumento de

1762 kg de soja por hectare computando com a inoculação tradicionalmente utilizada no país (Tabela 4; Anexo).

**Figura 2.** Efeito de diferentes tratamentos de inoculação de soja sobre a produtividade em grãos.



\* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Duncan (5% de probabilidade). Os tratamentos utilizados foram T1=Testemunha, T2=Adubação nitrogenada, T3=Inoculação Padrão, T4=) Inoculante turfoso com aditivo, T5= Coinoculação na semeadura, T6= Coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 2 inoculantes, T7= Coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 3 inoculantes, T8= Inoculação em pulverização pós emergência, T9= Inoculação 2 dias pré-semeadura com aditivo, T10= Inoculação 7 dias pré-semeadura com aditivo e T11= Inoculação 30 dias pré-semeadura com aditivo.

O Tratamento 2 (com adubação nitrogenada) resultou em 1450,15 kg de grãos a mais que o tratamento padrão, promovendo um aumento médio de 24 sacas de soja por hectare. Este resultado é decorrente do uso da adubação nitrogenada (SuperN<sup>®</sup>), da qual se utilizou 444,45 kg ha<sup>-1</sup>, e sendo que 45% deste é N, totalizou-se a aplicação de 200 kg ha<sup>-1</sup> de N. O SuperN<sup>®</sup> custa R\$1,20 o quilo, totalizando um gasto equivalente a R\$533,34 por hectare. Este valor gasto é superior quando comparado com o da utilização de inoculante, o qual não ultrapassa os 20,00 reais por hectare, tornando assim, os adubos nitrogenados inviáveis economicamente para a cultura da soja. Os resultados apresentados neste estudo mostram valores de produtividade semelhantes entre o tratamento de adubação nitrogenada e alguns dos tratamentos de inoculação, o que reforça o potencial de ganho econômico ao utilizarem-se

estas tecnologias microbianas. Segundo o manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, é dispensada a adubação nitrogenada para a cultura da soja, na qual se recomenda o uso de estirpes de rizóbios (ROLAS, 2004).

O tratamento 4 promoveu média de produtividade superior quando comparado ao tratamento 3. Neste tratamento foi utilizada a técnica de inoculação nas sementes com inoculante turfoso e a aditivo. O inoculante turfoso fornece as bactérias proteção física, e não é tão volátil quando comparado com o líquido, além de reter água, e deixar prontamente disponível para as bactérias. Deste modo as bactérias tem maior resistência à deficiência hídrica e também a temperaturas elevadas. Já o aditivo que compõe esta técnica tem função protetora sobre as bactérias características e também adesivas ao inoculante, tornando-o mais aderente as sementes (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). As características desta técnica podem estar associadas com os valores de produtividade apresentados, os quais foram superiores ao tratamento padrão. A utilização do aditivo pode ter gerado uma mistura do inoculante mais homogênea sobre as sementes, em comparação com o tratamento padrão que não contem o aditivo.

Os tratamentos 6 e 7 proporcionaram valores superiores de produtividade comparados ao tratamento padrão (T3). Estes são tratamentos de coinoculação que, segundo outros estudos, apresentam alto potencial de produtividade para a cultura da soja. Segundo o estudo realizado por Argaw et al. (2012), avaliou-se a resposta da coinoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Pseudomonas* sp, testando-se os tratamentos padrão (composto por adubação com ureia e superfosfato triplo) e dois tratamentos de coinoculação com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium diazoefficiens*. O tratamento padrão teve produtividade média de 1912,5 kg de grãos por hectare, enquanto em um dos tratamentos de coinoculação com a estirpe *Bradyrhizobium diazoefficiens* TAL-378, foi observada uma produtividade de 2226,7 kg por hectare. Em outro estudo, realizado por Bárbaro et al. (2009), observou-se que a coinoculação realizada nas sementes (realizada com *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense*) resultou em uma produtividade de 11% a mais que na inoculação

tradicional (BÁRBARO; MACHADO; BÁRBARO, et al., 2009). Segundo o estudo realizado por Hungria et al. (2013), pode-se observar que a coinoculação no sulco de semeadura com uma mistura de *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense* foi superior que inoculação padrão com *Bradyrhizobium*. Na safra de 2010/11 em Londrina, a cultura da soja teve um aumento de 243 kg ha<sup>-1</sup>, e na cidade de Ponta Grossa teve-se aumento de 167 kg ha<sup>-1</sup> (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Segundo este trabalho, para a realização da coinoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense*, o agricultor gasta em torno de quinze reais por hectare, com isso eleva sua produtividade 16% a mais sobre a média nacional (3.000 kg ha<sup>-1</sup>), totalizando um aumento de 480 kg de soja ou 8 sacos (ARAUJO, 2014).

Os trabalhos citados relatam o benefício que a utilização da coinoculação traz para a produtividade da soja. Conforme o que já foi discorrido no decorrer do trabalho, a coinoculação apresenta melhores resultados de produtividade que cada estirpe isolada. Além dos benefícios oriundos da coinoculação, podemos citar que ambos os tratamentos com valores superiores foram de pulverização. O inoculante pulverizado no sulco de semeadura fica disposto onde é colocado também as sementes. Com o início do desenvolvimento de raízes no solo, as bactérias se associam e iniciam a nodulação (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Além disso, a pulverização no sulco de semeadura minimiza problemas oriundos do tratamento de semente (WILLIAMS, 1984). A técnica de coinoculação em pulverização é apresentada como uma nova alternativa para o aumento de produtividade na cultura da soja.

O tratamento 8 (inoculação em pulverização pós emergência) resultou em aumento na produtividade de 60% quando comparado a inoculação tradicionalmente utilizada no país (Figura 2). Além deste estudo, existe mais um trabalho reportado no Brasil, que foi realizado por Zilli et al. (2008). Nele, o autor verificou resultados diferentes dos encontrados no presente estudo, onde a produtividade encontrada na inoculação padrão e na em pós-emergência não deferiram. Os tratamentos apresentaram valores médios de 2900 kg ha<sup>-1</sup>. Assim, esta técnica apresenta grande potencial produtivo, registrado no presente estudo. Além disso, a inoculação é realizada somente após as plantas

já estarem em seu período vegetativo, evitando assim o contato com as sementes, que foram tratadas com tratamento fitossanitário o qual pode vir a serem tóxicas as bactérias (EMBRAPA, 2004). A técnica de inoculação em pulverização pós-emergência, pode ser utilizada no lugar da inoculação padrão que é realizada nas sementes antes da semeadura. Onde, a inoculação padrão utilizada nos dias de hoje pode apresentar falhas, devido: à baixa qualidade do inoculante (sem as exigências do MAPA), aplicação de forma inadequada, temperatura, baixa umidade no solo, tratamento de sementes, com efeito, tóxico as bactéria, e inoculantes vencidos (ZILLI; MARSON; GIANLUPPI, et al., 2008). Deste modo, a utilização de inoculante após a emergência pode se apresentar como uma alternativa viável deixando livre dessas possíveis falhas e garantindo bons valores de produtividade.

No tratamento 10 foi realizada a inoculação 7 dias antes da semeadura com a presença de um aditivo. Este tratamento resultou em valores médios superiores ao tratamento 3. Em outro estudo, realizado por Zilli et al. (2010), foi testada a inoculação 5 dias antes do plantio, a qual apresentou produtividade média de 3800 kg por hectare, sendo que a inoculação padrão resultou em 3500 kg por hectare. Porém, as sementes utilizadas no referido estudo não passaram por nenhum tipo de tratamento químico. Além deste trabalho, existe um produto chamado Bioagro NG, com o qual é possível inocular sementes de soja 15 dias antes do plantio. Porém, o estudo é viável apenas para sementes que não passaram por nenhum tipo de tratamento (RUFINO, 2013). Os trabalhos citados mostram que a técnica de inoculação em pré-semeadura é eficiente, mas apenas para sementes que não passaram por tratamento químico. Isto representa um grande entrave no panorama agrícola brasileiro, pois a grande maioria das sementes de soja utilizadas no país são tratadas. Atualmente, uma vez inoculadas as sementes tratadas, se faz necessário a semeadura em 24 horas para que não ocorra a morte bacteriana. Esta necessidade é um problema, pois nesse período pode ocorrer chuvas ou a quebra de um maquinário, impossibilitando o plantio no período recomendado, perdendo assim a eficiência da inoculação. Portanto, este estudo dá fomento para a flexibilidade de tempo entre a inoculação e a semeadura, apresentado o tratamento 10 como uma técnica eficiente com capacidade de

trazer produtividade superior ao padrão e permitindo armazenamento após a inoculação.

Além do tratamento de inoculação em 7 dias antes do plantio, foi testado um tratamento de pré-inoculação 30 dias antes do plantio, o qual foi estatisticamente igual ao tratamento padrão. Esta observação confirma dados obtidos em safras anteriores na região de Curitiba, onde a produtividade foi superior estatisticamente com o tratamento de inoculação 30 dias antes da semeadura, quando comparado ao tratamento padrão (MUNHOZ, A.T.). Esta metodologia torna-se uma ótima alternativa, garantindo que as sementes inoculadas antes da realização do plantio contenham as bactérias vivas e, desta maneira, não percam a capacidade de nodular. Assim, é possível, armazená-las por um período prévio de até 30 dias à semeadura, sem que ocorram perdas de produtividade em comparação à tecnologia padrão atualmente adotada no Brasil.

Segundo Zilli et al. (2010), outros países já apresentam técnicas de pré-inoculação com antecedências ao plantio de alguns dias para várias outras culturas. No Brasil existe apenas um estudo para a cultura da soja de inoculação pré-semeadura com sementes tratadas. Nele, observou-se que a inoculação em um período prévio maior que 24 horas é uma alternativa que pode ser utilizada no lugar da inoculação tradicional utilizada no país, garantindo que não ocorram perdas de crescimento ou nodulação (MUNHOZ; RONSANI; ALMEIDA, et al., 2014). Até os dias de hoje além deste estudo para cultura da soja, não existem outros trabalhos.

O uso de sementes inoculadas com antecedência de alguns dias pode ser viabilizado segundo os resultados apresentados no trabalho realizado, tornando assim possível uma técnica que até o momento era inviável. A técnica é inovadora para a cultura da soja, garante o sucesso na nodulação e na produtividade igual ou superior à inoculação padrão, mesmo que a semeadura seja feita após 24 horas. Além destes benefícios será possível utilizar sementes que passaram por algum tratamento químico, sem que ocorram perdas e garantindo rendimentos satisfatórios. Dentre as sementes utilizadas no país, a grande maioria passa por algum tratamento. Desta maneira a

inoculação pré-semeadura torna-se uma técnica inovadora e satisfatória as exigências dos produtores.



## 4 CONCLUSÕES

A inoculação padrão em conjunto com um aditivo proporcionou nodulação e produtividade superior a inoculação padrão sem uso de aditivo. Assim, conclui-se que a inoculação padrão com inoculante turfoso em conjunto com aditivo garante melhores números de nodulação e produtividade.

A técnica de inoculação no sulco de semeadura proporcionou produtividade superior à inoculação tradicional, realizada diretamente nas sementes. Desta maneira a técnica de inoculação no sulco é viável e pode ser recomendada para a cultura da soja garantindo bons índices de nodulação e produtividade.

A inoculação de sementes de soja em conjunto com um aditivo, 7 dias antes da semeadura resultou em uma produtividade superior a inoculação padrão. Já as inoculações 2 e 30 dias antes da semeadura apresentaram produtividades iguais a padrão. Apesar da pré inoculação 7 dias ser superior e a pré inoculação 2 e 30 dias serem iguais a padrão, são técnicas viáveis e podem ser utilizadas garantindo que não aconteça a diminuição da nodulação ou perdas de produtividade.

O uso de mais de um inoculante aumentou a nodulação nas raízes e a produtividade, quando comparado ao uso de apenas um inoculante. A utilização da técnica de coinoculação com as estirpes *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA 5079 e 5080), recomendadas para cultura, associada a alguma destas estirpes em conjunto: *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6), *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis*, podem ser recomendadas para a cultura da soja garantindo maiores rendimentos.

O uso da inoculação após a emergência das plantas proporcionou maior nodulação e produtividade que a inoculação padrão realizada nas sementes. Deste modo a inoculação pós-emergência garante melhores resultados de nodulação e produtividade para a cultura da soja

## Inoculation techniques with nitrogen fixing bacteria in soybean

André Thiago Munhoz

### Abstract

Soybean (*Glycine max*) is one of the most important crops worldwide. Nitrogen is the most required nutrient for its development, which can be supplied by biological nitrogen fixation. This is the most adopted process in Brazil and it is performed by some genera of bacteria that are commercialized as inoculants. Inoculants are traditionally applied on seeds; however there are other methods such as in-furrow, post-emergence and coinoculation. The aim of this study was to evaluate the effects of different inoculation techniques on growth, nodulation and yield of soybean. The experiment was carried on in Ponte Alta do Norte – SC, in a randomized block design with five replicates. Sampling was performed at three stages, 32DAE, R2 and grain maturity. At 32 DAE, mean values of nodulation in primary roots were higher in treatment with peat inoculant with polymers compared to the standard inoculation procedure. Total number of nodules was higher in treatments of in-furrow inoculation and peat inoculant with polymers. Nodule dry weight was higher when inoculation was performed with peat inoculant and polymers and also in-furrow coinoculation with three strains of bacteria. Shoot dry weight was not different among treatments. At R2 stage, in-furrow coinoculation with three strains of bacteria promoted the highest means nodulation at the primary root. Post-emergence inoculation also increased number of nodules compared to the standard inoculation procedure. All variables related to nodulation at secondary roots were increased by in-furrow coinoculation with two strains of bacteria. Higher number of nodules was also observed with post-emergence inoculation. Total number of nodules per plant was increased by in-furrow coinoculation treatments. Nodule dry weight was not different among treatments. Grain yield was higher in the following treatments: mineral nitrogen, peat inoculant with polymers, seven-day pre-sowing inoculation with polymers, post-emergence and in-furrow inoculation. Based on the current findings, it is possible to recommend in-furrow, pre-sowing and coinoculation to soybean cultivation, once they result in growth and yield that are equal or superior to the standard inoculation technique.

**Keywords:** Soybean standard inoculation. In-furrow inoculation, post-emergence inoculation. Pre-sowing inoculation. Coinoculation.

## REFERÊNCIAS

AFZAL, A.; BANO, A.; FATIMA, M. **Higher soybean yield by inoculation with N-fixing and P-solubilizing bacteria.** *Agron. Sustain. Dev.*, v.30, n.2, p.487-495, abr./jun. 2010.

ARAÚJO, S.C. **Coinoculação incrementa produtividade de soja e feijão.** *Revista Campo & Negocio* 25 dez 2014. Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br/coinoculacao-incrementa-produtividade-de-soja-e-feijao/>>. Acesso: 11 mai. 2015.

ARAÚJO, S.C. **Inoculação da soja: uma prática altamente rentável** **Tecnologias buscam resultados produtivos para o agricultor.** *Informações Agronômicas* Nº 87. *Jornal da Coopavel*, Cascavel, p.10 out-1999. Disponível em: <[http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/92EBFBCA5611FC8C83257B8D004C142B/\\$FILE/page9-87.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-brasil.nsf/0/92EBFBCA5611FC8C83257B8D004C142B/$FILE/page9-87.pdf)>. Acesso: 27 abr. 2015.

ARAÚJO, A.S.F.; CARNEIRO, R.F.V.; BEZERRA, A.A.C.; ARAÚJO, F.F. **Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N<sub>2</sub> e o crescimento das plantas.** *Revista Ciência Rural*, ISSN 0103-8478. Santa Maria – RS. 2009

ARGAW, A. **Evaluation of Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and Phosphate Solubilizing *Pseudomonas* ssp. Effect on Soybean (*Glycine max* L. (Mer.)) in Assossa Area.** *J.Arg. Sci Tech.* Vol.14 213-224. 2012.

ATIENO, M.; HERRMANN, L.; OKALEBO R.; LESUEUR, D. **Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two diferente strains of *Bradyrhizobium japonicum*.** *World J Microbiol Biotechnol.* 28:2541-2550, 2012.

BÁRBARO, I.M.; MACHADO, P.C.; BÁRBARO, JUNIOR, L.S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F.B.; SILVA, J.A.A. **Produtividade da soja em resposta a inoculação padrão e coinoculação.** *Revista Colloquium Agrariae*, 5:01-07, 2009.

CAMPOS, L.J.M. **Coinoculação de Soja.** Informativo técnico – Núcleos de Sistemas Agrícolas da Embrapa Pesca e Aquicultura. *Fronteira Agrícola* nº 4 outubro de 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355321/2028532/4%C2%AA%20edi%C3%A7%C3%A3o+do+Fronteira+Agr%C3%ADcola/f3dab433-482f-40f2-8284-2ca33e1bf3aa>>. Acesso: 09 jun. 2016.

CAMPOS, B.C.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. **Eficiência da fixação biológica de N<sub>2</sub> por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Cruz Alta – RS, v.25, n.32, p.583-592. 2001.

CAPONE, A. **Divergência genética e seleção assistida por marcadores em soja tn.** Tese do doutorado em produção vegetal. Universidade Federal do Tocantins - Câmpus de Gurupi. Gurupi – TO, 2015. Disponível em: <<http://www.site.uft.edu.br/producaovegetal/teses/ARISTOTELES%20CAPONE.pdf>>. Acesso: 04 fev. 2016.

CEPA – Empresa de pesquisa agropecuária e extensão rural de Santa Catarina. **Santa Catarina - Comparativo das safras das principais lavouras – 2013/14 e 2014/15.** 2014. Disponível em: <[http://www.epagri.sc.gov.br/?page\\_id=2886](http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=2886)>. Acesso em: 04 mai. 2015.

CONAB- Companhia Nacional da Abastecimento. Safras 2013/2014. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 1 – Safra 2013/14, n. 7 – Sétimo Levantamento, abr. 2014.

CORREIA, A.M.P.; MARCHETTI, M.E. **Desempenho de soja transgênica ao glifosato e seu efeito na nodulação e produtividade da cultura.** Universidade Federal da Grande Dourados. Trabalho de conclusão da pós-graduação em Agronomia. Dourados – MS. 2013.

EMBRAPA. **Soja em números (safra 2014/2015) 2015.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso: 18 abr. 2016.

EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004.** Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/inoculacao.htm>>. Acesso: 29 abr. 2015.

GALAL, Y.G.M. **Dual inoculation with strains of *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* to improve growth and biological nitrogen fixation of soybean (*Glycine max* L.).** Biol Fertil Soils, v.24, n.3 p.317-322, mar. 1997.

GROPPIA, M.D.; ZAWOOZNIK, M.S.; TOMARO, M.L. **Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants.** Eur. J. Soil. biol. 34 (2),75-80. 1998.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. **Como a soja pode produzir mais. Rev. Cultivar Grandes culturas- ed.20 – 2000.** Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=345>>. Acesso: 04 fev. 2016.

HUNGRIA, M.; CAMPO R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja.** Londrina, Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516-7860; n.35).

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. **Co-inoculação de soja e feijão com rizóbio e azospirilla: estratégias para melhorar a**

**sustentabilidade.** Revista Biologia e Fertilidade do solo, v.49, n.7, p.791-801, jan. 2013.

MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio do Brasil. 2014.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso: 18/05/2015.

MARRA, L.M. **Fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos por bactérias isoladas de nódulos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) walp.].** Universidade Federal de Lavras – UFLA. Lavras-MG 2009. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp095204.pdf>>. Acesso: 08 jun. 2016.

MAZZUCHELLI, E.H.L.; MAZZUCHELLI, R.C.L.; ROMERO, E.F.; ROMERO, R.F.; ARAUJO, F.F. **Nodulação da soja em função da co-inoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *Bacillus subtilis*.** Resumo do trabalho de conclusão de curso de agronomia da Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE. 2014.

MISSÃO, M.R. **Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado.** Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais, v. 3, n.1 - p.7-15, jan./jun. 2006.

MOLLA, A.H.; SHAMSUDDIN, Z.H.; HALIMI, M.S.; MORZIAH, M.; PUTEH, A.B. **Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems.** Soil Biology & Biochemistry 33 457-463. 2001.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Universidade Federal de Lavras – UFLA. Lavras-MG 2006. Disponível em: <<http://www.prpg.ufla.br/solos/wp-content/uploads/2012/09/MoreiraSiqueira2006.pdf>>. Acesso: 08 jun. 2016.

MUNHOZ, A.T. **Efeito de técnicas de coinoculação e inoculação pré-semeadura da soja até 30 dias antes do plantio.** Safra 2013/14. Curitiba – SC. Trabalho realizado para testar o uso de inoculantes no prelo 2014.

MUNHOZ, A.T.; RONSANI, A.L.; ALMEIDA, R.; PURIN, S. **Efeito de técnicas de coinoculação e inoculação pré-semeadura da soja até 30 dias antes do plantio.** FertBio –Fertilidade e Biologia do Solo: Integração de tecnologia para todos. Araxá-MG. 2014.

ROLAS. **Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina / Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.** Comissão de Química e Fertilidade do Solo. - 10. ed. – Porto Alegre, 2004.

RONSANI, A.L.; PINHEIRO, M.G.; PURIN, P. **Efeitos de diferentes formulações e técnicas de inoculação no crescimento da soja.** XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Ago. 2013. Florianópolis – SC.

RUFINO, C. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. **Inoculante Biagro NG: aplicação e uso no processo de fixação biológica do nitrogênio.** 2013. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver\\_noticia.php?cod\\_noticia=855](http://www.cnpso.embrapa.br/noticia/ver_noticia.php?cod_noticia=855)>. Acesso: 22 abr. 2015.

SANTOS, A.D. **Viabilidade da inoculação de sementes de soja com produtos comerciais a base de *Bradyrhizobium japonicum* antes da semeadura.** Trabalho de conclusão curso da Universidade Federal do Paraná-Setor Palotina. Palotina-PR 2013.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Componente de Análise do Software Assistat – Estatística Atendendo em: World Congress on Computers in Agriculture, 7 Reno – NV – USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. Disponível em: <<http://www.assistat.com/indexp.html>>. Acesso: 22 abr. 2015

VIERA NETO, S.A.; PIRES, F.R.; MENEZES, C.C.E.; MENEZES, J.F.S.; SILVA, A.G.; SILVA, G.P.; ASSIS, R.L. **Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, 32:861-870, 2008.

WILLIAMS, P.M. **Current use of legume inoculant technology.** In: Alexander, M. Biological Nitrogen Fixation: ecology, technology, and physiology. Nova York: Plenum Press, 1984. p.173-200.

ZILLI, J.E.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R.J.; ROUWS, R.C.; HUNGRIA, M. **Inoculação da soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes.** Revista Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa. vol. 34, n. 6, p.1875-1881. 2010.

ZILLI, J.E.; MARSON, B.F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. **Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.43, n.4, p.541-544, abr.2008.

ZILLI, J.E.; RUBENS, J.C.; HUNGRIA, M. **Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.45, n.3, p.335-338, março de 2010.

ZILLI, J.E.; SILVA NETO, M.L.; FRANÇA JÚNIOR, I.; PERIN, L.; MELO, A.R. **Resposta do Feijão-Caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, 35:739-742, 2011.

ZILLI, J.E.; SMIDERLE, O.J.; FERNANDES JÚNIOR, P.I. **Eficiência agronômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura da soja em Roraima.** Revista Agro@mbiente, Roraima, v.4, n.2, p. 56-61, jul-dez, 2010.

## ANEXOS

Figura 3. Análise de determinação da presença de rizóbios no solo (NMP).





		Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Rod. Carlos João Strass - Distrito de Warta / Caixa Postal 231 - CEP 86001-970 Telefone (43) 3371 6000 - Fax (43) 3371 6100 Londrina- Paraná- Brasil	
<b>Certificado de Análise</b> <b>Contagem de Células pelo Número Mais Provável</b>			N°028/15 Pág 01/01
Solicitante: Sonia Purin da Cruz			
Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina – Rod. Ulisses Gaboardi, Km 3, Fazenda Pessegueirinho, Curitiba-SC CEP.: 89520-000			
Data de Recebimento da Amostra: 01/12/2015			
Lote:	Não Aplicável (NA)	Fabricação:	NA
Validade:	NA		
Descrição do Produto/Amostra:		Amostra de Solo para Contagem de bactérias diazotróficas associativas Código interno 092/15	
Data de Realização de Ensaio: Início em 08/12/2015			
<b>Metodologias Utilizadas</b> 1) Métodos analíticos aprovados pela Instrução Normativa DAS/MAP 30/2010 de 12/11/2010, publicado no D.O.U. de 17/11/2010, Consistindo em inoculação de diluições seriadas das amostras em meio semi-sólido NFb, avaliando a presença de película nos frascos do teste, característica dos organismos diazotróficos associativos.			
Produto/ Lote		Número de Células de Bactérias /g	
Código Interno 092/15		3,0 10 <sup>3</sup> bactérias/g	
Observação: Número de Cadastro do Laboratório no MAPA: LAB PR-00037.			
Londrina, 15 de 12 de 2015.			
 Dra. Mariangela Hungria da Cunha CPF do Responsável Técnico: 964536998-34 CREA- nº. PR 89186/D Responsável Técnico pela Análise no Laboratório de Biotecnologia do Solo			



Figura 4. Análise físico-química do solo da área de estudo.


**SOLANALISE**  
 CENTRAL DE ANÁLISES LTDA.

Av. Rocha Pombo, 170 \* Jd. Gramado  
 CASCAVEL - PR \* CEP 85.816-540  
 Telefone / Fax: (45) 3227 1020  
 CNPJ 85.473.338/0001-13  
 E-mail: solanalise@solanalise.com.br  
 Home Page: www.solanalise.com.br



---

Cliente: CULTIVAR DISTRIBUIDORA DE INSUMOS AGRICOLAS LTDA  
 Nome: ROBERTO DE ALMEIDA  
 Propriedade: SDE  
 Lote Rural: SDE  
 Matricula: SDE  
 Localidade: SDE  
 Município: Ponte Alta *antes da correção*  
 Amostra: HERNESTO SANDRI  
 Área:

Data Entrega: 25/03/2014  
  
 Data Coleta: 25/03/2014  
  
 Estado: SC  
  
 Controle: 13010 / 2014

---

Resultado de Análise de Solos			INTERPRETAÇÃO		
ELEMENTOS		Cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup>	BAIXO	MÉDIO	ALTO
Cálcio	Ca	0.39	■■■■		
Magnésio	Mg	0.24	■■■■		
Potássio	K	0.09	■■■■		
Sódio	Na				
Alumínio	Al	1.42			■■■■
H + Alumínio	H + Al	7.20			■■■■
Soma de bases	S	0.72	■■■■		
C T C pH 7.0	T	7.92		■■■■	
C T C efetiva	t				
g /dm <sup>3</sup>					
Carbono	C	11.83		■■■■	
M. Orgânica	MO	20.35		■■■■	
%					
Sat. Alumínio	Al	66.36			■■■■
Sat. Bases	V	9.09	■■■■		
Argila	Arg				
mg/dm <sup>3</sup>					
Boro	B				
Enxofre	S				
Ferro	Fe				
Manganês	Mn				
Cobre	Cu				
Zinco	Zn				
pH Água		4.70			
pH SMP		5.50			
pH CaCl <sub>2</sub>		4.00			


GRANULOMETRIA %	
Areia:	
Silte:	
Argila:	
Classificação do Solo, Tipo:	


FÓSFORO	
mg/dm <sup>3</sup>	
Fósforo P	5.64
Fósforo Rem. NCP	17.10
Nível Crítico de Fósforo	10.642
Fósforo Relativo PR	52.995

RELAÇÕES Cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup>			
Ca / Mg	Ca / K	Mg / K	K/ Ca+Mg
1.63	4.33	2.67	0.11

K%	Ca%	Mg%	H%	Al%
1.14	4.92	3.03	72.98	17.93

Cascavel, 31 de Março de 2014

  
 Decio Carlos Zocoler  
 Químico Responsável  
 CRQ 09100089 - 9ª Região

  
 Daniel Piorio Zocoler  
 Químico Industrial  
 CRQ 09202405 - 9ª Região

Confira a autenticidade deste laudo em [www.solanalise.com.br](http://www.solanalise.com.br) com a chave MjAxNHwxMzAxMA==

Extrator Mellich: K - P - Fe - Mn - Cu e Zn, Extrator KCl: Ca - Mg - Al, Extrator HCl 0,05 N: B, Extrator Fosfato de Cálcio: S, Extrator Dicromato de sódio: Carbono

NESTE LAUDO NÃO CONSTA RECOMENDAÇÃO DE ADUBOS E CORRETIVOS

**Tabela 4.** Efeito de diferentes tratamentos de inoculação de soja sobre a produtividade em grãos.

Tratamento	Produtividade (Kg ha <sup>-1</sup> )
T1	2731,84 c
T2	4445,9 ab
T3	2905,75 c
T4	3562,74 ab
T5	3077,33 bc
T6	3952,76 ab
T7	3691,51 ab
T8	4668,19 a
T9	3276,41 bc
T10	3938,28 ab
T11	3023,79 c

\* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Duncan (5% de probabilidade). Os tratamentos utilizados foram T1=Testemunha, T2=Adubação nitrogenada, T3=Inoculação Padrão, T4=) Inoculante turfoso com aditivo, T5= Coinoculação na semeadura, T6= Coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 2 inoculantes, T7= Coinoculação em pulverização no sulco de semeadura com 3 inoculantes, T8= Inoculação em pulverização pós emergência, T9= Inoculação 2 dias pré-semeadura com aditivo, T10= Inoculação 7 dias pré-semeadura com aditivo e T11= Inoculação 30 dias pré-semeadura com aditivo.